



(11) **EP 0 781 349 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
15.01.2003 Patentblatt 2003/03

(51) Int Cl.7: **C12Q 1/04, C12N 9/36,
C12N 15/55**

(21) Anmeldenummer: **95932002.9**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/EP95/03512

(22) Anmeldetag: **07.09.1995**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 96/007756 (14.03.1996 Gazette 1996/12)

(54) **AUFSCHLUSS VON BAKTERIENZELLEN DURCH PHAGENLYSINE**

DECOMPOSITION OF BACTERIA CELLS BY PHAGE LYSINS

DISSOLUTION DE CELLULES BACTERIENNES PAR DES LYSINES DE PHAGES

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH DE FR GB LI

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 0 510 907 WO-A-94/06931
WO-A-95/05483

(30) Priorität: **09.09.1994 DE 4432053**
24.02.1995 DE 19506615
06.03.1995 EP 95301416

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.07.1997 Patentblatt 1997/27

(73) Patentinhaber: **Biotech Laboratories Limited**
Ipswich, Suffolk IP5 7RG (GB)

(72) Erfinder:
• **SCHERER, Siegfried**
D-85350 Freising (DE)
• **LÖSSNER, Martin**
D-85350 Freising (DE)
• **STEWART, Gordon, S., A., B.**
Loughborough, Leicestershire L11 0QL (GB)
• **SCHUBERT, Peter**
D-64285 Darmstadt (DE)

(74) Vertreter: **Wilkinson, Stephen John et al**
Stevens, Hewlett & Perkins
1 St. Augustine's Place
Bristol BS1 4UD (GB)

- **NATO ASI SERIES, Bd. H65, 1992 Seiten 427-431, J. PAYNE ET AL. 'Cloning and characterisation of a lysin gene from Listeria bacteriophage.' in der Anmeldung erwähnt**
- **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 58, Nr. 1, - Januar 1992. Seiten 296-302, R. ZINK ET AL. 'Classification of virulent and temperate bacteriophages of Listeria spp. on the basis of morphology and protein analysis.'**
- **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 61, Nr. 3, März 1995 Seiten 1150-1152, M. J. LOESSNER ET AL. 'A new procedure for efficient recovery of DNA, RNA, and proteins from Listeria cells by rapid lysis with a recombinant bacteriophage endolysin.'**
- **MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 16, Nr. 6, 26. Juli 1995 Seiten 1231-1241, M. J. LOESNER ET AL. 'Heterogeneous endolysins in Listeria monocytogenes bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes.'**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

EP 0 781 349 B1

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

5 **[0001]** Die Erfindung betrifft bestimmte Phagenlysine und Nukleinsäuresequenzen, die diese Phagenlysine codieren.

Stand der Technik

10 **[0002]** Für den Nachweis und die Bestimmung von Bakterien dienen neben extrazellulären Bestandteilen oft zelluläre Bestandteile, z.B. Adenosintriphosphat (ATP) für den Nachweis von Bakterien oder chromosomale DNS oder ribosomale RNS als Zielanalyt für Nukleinsäure-Sonden oder für die Nukleinsäureamplifikation. Zur Untersuchung derartiger zellulärer Bestandteile von Bakterien (z.B. chromosomale DNS, Plasmide, RNS, Proteine, Lipide, Metabolite) müssen die Zellen möglichst schnell und schonend aufgeschlossen werden, um die Integrität und Funktionalität der isolierten Bestandteile und Makromoleküle zu gewährleisten und um die Analyte zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit in hoher Ausbeute zu isolieren. Zu den bekannten Methoden gehört die Anwendung von Lysozym oder Mutanolysin (lysierendes Enzym aus *Streptomyces globisporus*). Auch in Kombination mit Detergenzien erfordert diese Methode erhöhte Temperaturen und ein alkalisches Medium bei oft langen Inkubationszeiten. Unter diesen Bedingungen sind viele Analyte instabil.

20 **[0003]** Für den Nachweis von Bakterien wird in WO 94/06 931 vorgeschlagen, die Bakterienzellen mit Phagen zu lysieren und anschließend beispielsweise das ATP mittels bekannter Methoden nachzuweisen. Bakteriophagen weisen im allgemeinen enge Wirtsbereiche auf. Bei der Durchführung dieses Verfahrens muß außerdem mit vermehrungsfähigen Viren gearbeitet werden; eine Verfahrensweise, die für die Routineanalytik aus Sicherheitsgründen bedenklich ist. In EP 0 168 933 werden rekombinante Phagen offenbart, die das lux-Gen inseriert enthalten.

25 **[0004]** Phagenlysine aus verschiedenen phageninfizierten Bakterien wurden beschrieben. In DE 43 26 617 wird beispielsweise die Verwendung von Lysinen aus Listeriaphagen als spezifisches Desinfektionsmittel gegen Listerien offenbart. Weitere Listeriaphagen sind in der Literatur beschrieben: z.B. von Loessner und Busse (1990) Appl. Environ. Microbiol. **56**, Seiten 1912 - 1918, und von Loessner et al. (1994) J.Gen.Virol. **75**, Seiten 701 - 710. Dabei wurde gefunden, daß bestimmte Phagenlysine Zellen von Bakterien der Gattung *Listeria* lysieren, wohingegen der Phage, durch dessen genetische Information diese Lysine codiert werden, lediglich bestimmte *Listeria*-Arten oder sogar nur bestimmte *Listeria*-Stämme infiziert und lysiert. Durch Phagenlysine hervorgerufenen Bakteriolyse kann äußerst spezifisch sein; einige Bakteriophagen infizieren und lysieren nur bestimmte Serotypen von Bakterien. Es gibt aber auch Phagenlysine mit wesentlich breiterem Lysespektrum: So wird beispielsweise in JP 04/141 089 ein Phagolysin offenbart, das ein ähnlich breites Lysespektrum wie Lysozym aufweist. Eigenschaften von Phagenlysinen aus Bakteriophagen, die Gram-negative Bakterien infizieren, wurden von Young (1992) in Microbiol. Rev. **56**, Seiten 430 - 481 zusammengestellt. Lysine aus Phagen, die Gram-positive Bakterien infizieren, sind von verschiedenen Autoren beschrieben: Paces et al. (1986) Gene **44**, Seiten 115 - 120; Saedi et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, Seiten 955 - 958; Boizet et al. (1990) Gene **94**, Seiten 61 - 67; Garcia et al. (1990) Gene **86**, Seiten 137 - 142; Ward et al. (1993) Canad. J. Microbiol. **39**, Seiten 767 - 774; Shearman et al. (1994) Mol. Gen. Genet. **216**, Seiten 214 - 221. In J. Bact. **107**, Seite 499 - 504 (1971) werden Phagenlysine beschrieben, die spezifisch Zellen der Bakteriengattung *Staphylococcus* lysieren. In Chemical Abstracts **84** 1596 (1976) wird auf Phagenlysine hingewiesen, die nur bestimmte Clostridienarten lysieren.

40 **[0005]** Gegenstand der Erfindung sind gereinigte Lysine aus Listeriaphagen der Stämme A118, A500 und A511, sowie die Nukleinsäuresequenzen, die die Lysine codieren.

45 **Beschreibung der Erfindung**

[0006] Nachweisverfahren für Bakterien, bei denen zelluläre bakterielle Bestandteile zur Reaktion gebracht werden, sind in großer Zahl bekannt. Es war auch bekannt, dass unter zellulären Bestandteilen neben Bestandteilen aus dem Zellinnern auch durch die Lyse freigesetzte Bestandteile der Zellwand verstanden werden. Dazu gehören der Nachweis von Enzymen, die nur bei bestimmten Species oder Gruppen von Bakterien vorkommen, z.B. Glucosidase, β -Galactosidase oder Enzyme der oxydativen Phosphorylierung (siehe z.B. EP-A-0 510 907). Weiterhin gehören dazu Nachweisreaktionen auf Nukleinsäuren mittels Nukleinsäuresonden oder Amplifikationsverfahren. Ein weiteres bekanntes Nachweisverfahren beruht auf dem Nachweis von ATP, beispielsweise durch die Messung der Lumineszenz, die bei der Luciferin-Luciferase-Reaktion auftritt. Derartige Verfahren, sowie die Optimierung von Verfahrensvarianten sind dem Fachmann geläufig und in der Literatur beschrieben. Erfindungsgemäß werden diese Reaktionen als übliche Nachweisverfahren zusammengefaßt. Die Reagenzien, die für diese Nachweisverfahren notwendig sind, werden als übliche Nachweismittel bezeichnet.

[0007] Beispiele für derartige Nachweismittel sind folgende Zusammenstellungen:

- a) für den Nachweis von Enzymen umfassend einen Puffer und ein Enzymsubstrat ;
- b) für den Nachweis spezieller Nukleinsäureabschnitte umfassend eine Nukleinsäuresonde, die mittels einer Markierung nachweisbar ist;
- c) für die Amplifikation spezieller Nukleinsäureabschnitte umfassend zwei Nukleinsäureprimer, ein Gemisch der Nukleotidtriphosphate und eine Nukleinsäurepolymerase;
- d) für den Nachweis von ATP umfassend Luciferin und Luciferase beispielsweise aus Leuchtkäfern.

[0008] So werden in Infect.Immunity **58**, 1943 - 1950 (1990) für den Nachweis von Listerien geeignet DNS-Sonden beschrieben. Für den Nachweis von Listerien geeignete Primer werden in EP 0 576 842 offenbart. Beide Dokumente offenbaren Einzelheiten über Verfahrensparameter für derartige Nachweisreaktionen, sowie weitere Literatur, die zugehörige Verfahrensvarianten offenbart.

[0009] Der ATP-Nachweis mit der Luciferin-Luciferase-Reaktion ist nicht spezifisch für bestimmte Organismen, da ATP in allen lebenden Zellen vorkommt. Wird dieser Nachweis jedoch erfindungsgemäß mit einem Phagenlysin kombiniert, das spezifisch für eine bestimmte Bakteriengattung ist, so wird die Nachweisreaktion insgesamt spezifisch. Wird mittels eines Phagenlysins mit breitem Wirkungsspektrum DNA freigesetzt und erfolgt der Nachweis mittels einer spezifischen DNA-Sonde, so ist wiederum die Nachweisreaktion insgesamt spezifisch.

[0010] Phagenlysine sind Enzyme oder Enzymkomplexe, die Lysis von Bakterien bewirken, und die im Phagen-genom codiert sind. Phagenlysine wurden aus zahlreichen mit Bakteriophagen infizierten Bakterienzellen gewonnen und aufgereinigt. Entsprechend ihrer Spaltungsspezifität gehören Phagenlysine zu drei verschiedenen Enzymgruppen: Glucosidasen, Amidasen und Endopeptidasen. Beispiele für solche dem Fachmann bekannten Phagenlysine sind in den bereits genannten Dokumenten offenbart. Phagenlysine können aus kultivierten phageninfizierten Bakterien gewonnen werden. Bevorzugterweise werden die Phagenlysine jedoch aus Kulturen von Bakterien, z.B. Escherichia coli, gewonnen, wobei die Bakterien durch dem Fachmann bekannte Rekombinationstechniken in die Lage versetzt werden, die gewünschten Phagenlysine zu produzieren, siehe z.B. EP-A-0 510 907.

[0011] Aus Lysaten von Bakterien der Gattung Listeria, die mit Listeriaphagen A 511, A 500 oder A 118 infiziert wurden, können Phagenlysine (bezeichnet als PLY 511, PLY 500 beziehungsweise PLY 118) hergestellt werden, die eine schnelle (d.h. innerhalb von 2-6 Minuten) und vollständige (95-100 %) Zellwand-Hydrolyse ermöglicht. Dabei werden neben Bestandteilen des Zellinnern (chromosomale DNS), Plasmide, RNS, Proteine, etc.) auch sämtliche Zellwand-assoziierten (nicht-kovalent gebundenen) Proteine freigesetzt. Alle Makromoleküle liegen anschließend nativ vor, sind aktiv und keiner chemischen Schädigung ausgesetzt. Erfindungsgemäß verwendbare Phagenlysine können auch durch Rekombinationstechniken, beispielsweise aus rekombinanten Stämmen von Escherichia coli, gewonnen werden, die die Phagolysin-Gene *ply* 511, *ply* 500 oder *ply* 118 (aus den Phagen A 511, A 500 beziehungsweise A 118) auf einem Expressionsplasmid tragen. Hierbei können die Zellen in hoher Ausbeute (bis zu 20 % des Gesamt-Proteins) Lysine produzieren. Diese rekombinanten Enzyme lassen sich leichter isolieren und reinigen, und weisen dieselbe Spezifität bei keiner nachweisbaren Fremdaktivität auf. Die gereinigten Phagenlysine werden in einem wäßrigen Puffer bei -30 °C aufbewahrt. Die Phagenlysine PLY 511, PLY 500 und PLY 118, sowie die zugehörigen Gene *ply* 511, *ply* 500 und *ply* 118 wurden bisher nicht in Einzelheiten beschrieben.

[0012] Im ersten Verfahrensschritt wird die Probe, die die nachzuweisenden Bakterien enthält, mit einem Phagenlysin unter Bedingungen, die die Lyse erlauben, inkubiert. Entsprechend der analytischen Aufgabe wird dabei ein Lysin mit geeigneter Spezifität eingesetzt, z.B. für den Nachweis von Listerien das Phagenlysin PLY118. Für derartige enzymatische Reaktionen geeignete und übliche Bedingungen sind grundsätzlich dem Fachmann bekannt: Die Inkubationstemperatur beträgt typischerweise 4 - 40 °C oder auch Raumtemperatur (20 - 30 °C); die Inkubationsdauer beträgt 2 - 20 Minuten in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge; die Reaktion wird bei einem pH von 5 - 10, insbesondere von 7 - 9, ausgeführt. Die freigesetzten zellulären Bestandteile der Bakterien werden anschließend wie bereits erwähnt nachgewiesen.

[0013] Erfindungsgemäß werden unter dem Begriff gereinigte Phagenlysine Enzympräparationen verstanden, die durch dem Fachmann grundsätzlich bekannten Verfahrensschritten aus einem Rohextrakt soweit gereinigt wurden, daß sie für die Lyse geeignet sind und beispielsweise die folgende Nachweisreaktion störendes Material, beispielsweise aus dem Rohextrakt stammendes ATP oder aus dem Rohextrakt stammende Nukleinsäuren, entfernt sind.

[0014] Es ist dem Fachmann bekannt, daß häufig wesentliche Eigenschaften von Proteinen durch den Austausch von wenigen Aminosäuren nicht verändert werden. Dies gilt insbesondere, wenn die ausgetauschten Aminosäuren ähnliche Eigenschaften aufweisen. Zusammenstellungen von Gruppen von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften sind beispielsweise von M.O. Dayhoff (1972) Atlas of Protein Sequence and Structure Vol. 5, Seite 98 beschrieben. Derartig abgewandelte Proteine werden häufig als Muteine bezeichnet. Deswegen umfassen die in dieser Anmeldung mit ihrer Aminosäuresequenz offenbarten Lysine aus Listeriaphagen (PLY511, PLY500 und PLY118) neben den in den SEQ.ID.NO.'s: 4 - 6 angegebenen Sequenzen auch zugehörige Muteine, insbesondere solche, die durch Aminosäureaustausch entsprechend den Tabellen von M.O. Dayhoff aus der offenbarten Sequenz hervorgehen.

[0015] Dem Fachmann ist weiterhin bekannt, daß der genetische Code degeneriert ist: Bestimmte Aminosäuren in

Proteinen können auf verschiedene Weise durch Triplets von Nukleotiden codiert werden. Soweit erfindungsgemäß Nukleinsäuresequenzen offenbart werden, die bestimmte Proteine codieren, umfaßt diese Offenbarung auch Abwandlungen entsprechend der Degeneration des genetischen Codes.

5 Beispiele

[0016] Die folgenden Beispiele sollen den Erfindungsgedanken näher erläutern; sie stellen keine Einschränkung des Erfindungsumfanges dar.

10 Beispiel 1: Lyse von Bakterienzellen

[0017] Zellen von *Listeria monocytogenes* (WSLC 1001; serovar 1/2c) werden in 10 ml Tryptose-Nährlösung bei 30 °C bis in die spät-logarithmische Wachstumsphase kultiviert und in 2 ml Portionen durch Zentrifugation bei 15 000 x g (1 Minute) geerntet. Für den Lysetest wird der Zellschlag in 900 µl Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert, auf 30 °C temperiert und mit 100 µl einer Lösung von 10 U PLY 118 versetzt. (Eine Einheit (U) Phagenlysin verringert in einem Volumen von 1 ml bei einer Temperatur von 30 °C bei einem pH von 8,0 die Extinktion bei 600 nm einer Suspension von Zellen von *Listeria monocytogenes* WSLC 1001 um 0,01/min.) Die Lysereaktion wird durch Messung der Trübung bei 600 nm verfolgt. Nach 8 - 10 Minuten ist die Lösung klar.

[0018] Mit ähnlichem Ergebnis läßt sich der Versuch mit Zellen von *Listeria ivanovii* (WSLC 3009; serovar 5) und anderen *Listeria*-Arten wiederholen.

Beispiel 2: Klonierung, Sequenzermittlung und Analyse der *ply*-Gene der Listeriaphagen A118, A500 und A511 und deren Genprodukte

[0019] Genombibliotheken aus DNA der Listeriaphagen A118, A500 und A511 wurden erstellt, indem DNA-Bruchstücke mit *TaqI*- oder *Tsp509I*-DNasen erzeugt und in *Clal*- oder *EcoRI*-Positionen von pSP72 integriert wurden. Phagolysin exprimierende Klone wurden durch Nachweis des lysierenden Phänotyps selektiert.

[0020] Die inserierten Anteile von positiv reagierenden Klonen wurden durch Behandlung mit Restriktionsendonukleasen aus der Plasmid-DNA gewonnen und durch Southern Hybridisierung mit markierter Phagen-DNA bezüglich Größe und Identität des Fragments untersucht. Von jeweils einem Klon aus jedem Phagen-DNA-Fragment wurde die vollständige Sequenz ermittelt.

[0021] In allen drei Fällen war die Zuordnung zu dem lysin-codierenden Leseraster möglich:

Phage	Gen		Lysin		
	Bezeichnung	Länge	Bezeichnung	Länge	kDalton
A118	<i>ply118</i>	846	PLY118	281	30,8
A500	<i>ply500</i>	870	PLY500	289	33,4
A511	<i>ply511</i>	1024	PLY511	341	36,5

[0022] Die genannten Lysine wurden jeweils aus den E.coli Rohextrakten mittels Ionenaustausch- und Gelpermeationschromatographie bis zu einer Homogenität von mindestens 80 % aufgereinigt (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese).

[0023] Das pH-Optimum dieser Lysine liegt bei 8,0-8,5; sie sind im pH-Bereich von 5,5 bis 10 aktiv. Viele übliche Puffersysteme können verwendet werden. Die höchste enzymatische Aktivität wurde bei 30 - 37 °C gemessen, jedoch sind die Enzyme auch bei 4 °C aktiv. Natrium- und Kaliumionen aktivieren diese Lysine, ebenso das Detergenz Polyethylenglycolmono-[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether (Triton® X-100; 0,05-0,1 Gew.-%). Dithiothreitol im Bereich von 0,1 bis 1,0 mM hatte keinen Effekt auf die Aktivität.

50 Beispiel 3: Isolierung von m-RNS

[0024] Zur Isolierung von m-RNS aus Kulturen von *Listeria monocytogenes* werden die Zellen in kleinen Volumina (ca. 1-5 ml) durch Zentrifugation konzentriert, kurz in einem Trockeneis-Ethanol Gemisch eingefroren (ca. 1-5 min.), und in 1/10 Volumen Puffer (Tris-HCl, 20 mM, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe einer geringen Menge des rekombinanten Lysins (Phagolysin aus Listeriaphagen A118, in 20 mM Tris-HCl, pH 7,3, 20 mM NaCl, 0,1 % Triton X100) wird etwa 2-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis die trübe Suspension fast völlig klar geworden ist. Nach Deproteinierung der Suspension (mit Phenol:Chloroform:isoamylalkohol, 125:24:1 (V/V), pH 4,2) kann die RNS durch

ethanolische Fällung direkt gewonnen werden. Reste von DNS können gegebenenfalls durch hydrolytische Spaltung mit DNAse entfernt werden. Die nun völlig reine RNS steht für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Beispiel 4: Spaltungsspezifität des Phagolysins PLY118

[0025] Rein- und Mischkulturen von verschiedenen Bakterien werden hergestellt:

- a) *Listeria monocytogenes*
- b) *Listeria ivanovii*
- c) *Staphylococcus aureus*
- d) *Bacillus cereus*
- e) *Escherichia coli*
- f) Mischkultur aus *Staph. aureus*, *B. cereus* und *E. coli*
- g) Mischkultur aus *L. monocytogenes*, *Staph. aureus*, *B. cereus* und *E. coli*.

Die Bakterienzellen werden anschließend gewonnen und unter Bedingungen, wie sie im wesentlichen im Beispiel 1 genannt sind, mit Lysin PLY118 lysiert. Das ATP im Lysat und auch als Kontrollmessung (ohne Zusatz von Lysin) wird durch Lumineszenzmessung bestimmt.

[0026] Alle Kontrollmessungen zeigen, daß ohne Zugabe von Lysin keine nennenswerte Zelllysis gefunden wird. Weiterhin zeigt sich, daß nur Zellen der Gattung *Listeria* lysiert werden, wobei die Lyse unabhängig von Begleitflora sowohl in Reinkultur als auch in Mischkultur erfolgt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

[0027]

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: MERCK PATENT GmbH
- (B) STRASSE: Frankfurter Str.
- (C) ORT: Darmstadt
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 64293
- (G) TELEFON: (06151) 72 78 40
- (H) TELEFAX: (06151) 72 71 91

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Aufschluss von Bakterienzellen durch Phagenlysin

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 44 32 053.1
- (B) ANMELDETAG: 09-SEP-1994

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 195 06 615.4
- (B) ANMELDETAG: 23-FEB-1995

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: EP 95 301 416.4

(B) ANMELDETAG: 06-MAR-1995

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

[0028]

10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LANGE: 846 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

15

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

20

(B) STAMM: A 118 Listeria - Phage

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

25

ATGACAAGTT	ATTATTATAG	TAGAAGTTTA	GCGAATGTAA	ATAAGTTAGC	AGACAATACG	60
AAAGCGGCAC	G TAGAAAATT	GCTAGATTGG	TCTGAAAGCA	ACGGGATTGA	AGTATTAATC	120
TACGAAACAA	TTAGAACGAA	AGAACAACAA	GCCGCAATG	TTAACAGTGG	AGCGTCTCAA	180
ACAATGCGCT	CTTATCACTT	GGTAGGACAA	GCGCTAGATT	TCGTCATGGC	GAAAGGTAAA	240
ACGGTTCGATT	GGGGTGCTTA	TCGTTTCAGAC	AAAGGCAAGA	AATTTGTGGC	AAAGGC AAAA	300
TCTTTAGGTT	TTGAGTGGGG	TGGTGATTGG	TCTGGATTTG	TAGACAATCC	GCACCTTCAA	360

35

40

TTTAATTATA	AAGGCTATGG	GACTGATACT	TTTGAAAAAG	GAGCTAGTAC	TAGTAATTCA	420
TCTAAACCGA	GCGCAGACAC	AAACACAAAC	AGTCTAGGAT	TAGTAGATTA	TATGAATTTA	480
AATAAACTAG	ATTCAAGCTT	TGCGAATCGC	AAAAAACTAG	CGACAAGTTA	CGGAATTAAA	540
AATTACAGTG	GAACAGCAAC	GCAGAACACA	ACATTATTAG	CGAAGTTAAA	AGCAGGAAAA	600
CCACACACAC	CAGCAAGCAA	AAACACATAC	TACACAGAAA	ATCCGCGAAA	AGTTAAAACA	660
CTAGTACAAT	GTGATCTATA	CAAATCAGTA	GACTTTACAA	CAAAAAACCA	AACAGGTGGA	720
ACATTTCCGC	CAGGCACAGT	CTTCACGATT	TCAGGGATGG	GGAAAACGAA	AGGCGGAACA	780
CCTCGCTTGA	AGACGAAGAG	CGGTTACTAT	CTCACTGCTA	ACACGAAGTT	TGTTAAAAAG	840
ATTTAG						846

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

[0029]

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 870 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

10 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

15 (B) STAMM: A 500 Listeria - Phage

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

20 ATGGCATTAA CAGAGGCATG GCTAATTGAA AAAGCAAATC GCAAATTGAA TGCTGGGGGA 60
 ATGTATAAAA TTACATCGGA TAAAACACGA AATGTAATTA AAAAAATGGC AAAAGAAGGT 120
 25 ATTTATCTTT GTGTTGCGCA AGGTTACCGC TCAACAGCGG AACAAAATGC GCTATATGCA 180
 CAAGGGAGAA CCAAACCTGG AGCAATTGTT ACTAATGCCA AGGGCGGGCA ATCTAATCAC 240
 AACTACGGGG TAGCTGTTGA CTTGTGCTTG TATACAAATG ACGGAAAAGA TGTATTATTGG 300
 30 GAGTCAACAA CTTCCCGGTG GAAAAAGGTT GTTGCTGCTA TGAAAGCAGA AGGGTTTAAA 360
 TGGGGCGGAG ACTGGAAAAG TTTTAAAGAC TATCCGCATT TTGAACTATG TGATGCTGTA 420
 AGTGGTGAGA AAATCCCTGC TGCAACACAA AACACTAATA CAAATTCAAA TCGTTACGAG 480
 35 GGTAAAGTCA TTGATAGCGC ACCACTGCTA CCGAAAATGG ACTTTAAATC ATCACCATTTC 540
 CGCATGTATA AGGTAGGAAC TGAGTTCTTA GTATATGATC ATAATCAATA TTGGTACAAG 600
 ACATACATTG ATGACAAACT TTA CTACATG TATAAAAGCT TTTGCGATGT TGTAGCTAAA 660
 40 AAAGACGCAA AAGGTCGCAT CAAAGTTCGA ATTTAAAGCG CGAAAGACTT GCGTATTCCA 720
 GTCTGGAATA ACATAAAATT GAATTCTGGG AAAATTAAAT GGTATGCACC CAATGTAAAA 780
 CTAGCGTGGT ACAACTATCG AAGAGGATAT TTAGAGCTAT GGTATCCGAA CGACGGCTGG 840
 45 TATTACACAG CAGAATACTT CTTAAAATAA 870

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

50

[0030]

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

55 (A) LÄNGE: 1026 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

EP 0 781 349 B1

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

5 (B) STAMM: A 511 Listeria - Phage

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

10	ATGGTAAAT ATACCGTAGA GAACAAAATT ATTGCAGGAT TACCTAAAGG TAAACTAAAA	60
	GGGGCTAACT TTGTTATTGC TCATGAAACT GCAATAGCA AGTCTACTAT TGACAATGAA	120
	GTAAGCTACA TGACTAGGAA CTGGAAGAAC GCATTTGTAA CTCACCTTGT AGGTGGCGGA	180
15	GGTAGAGTCG TTCAGGTTGC TAATGTAAAC TATGTTTCTT GGGGAGCAGG TCAGTATGCT	240
	AACTCTTATT CCTATGCGCA GGTAGAGTTG TGCCGTACAA GTAATGCAAC TACATTTAAG	300
	AAAGACTATG AAGTGTACTG TCAATTACTA GTAGACCTAG CTAAGAAAGC AGGTATCCCT	360
20	ATTACACTTG ACTCTGGTAG TAAACTAGT GATAAAGGTA TTAAATCCCA TAAATGGGTT	420
	GCTGATAAGC TAGGAGGAAC AACACACCAA GACCCATATG CTTACTTAAG CTCATGGGGT	480
	ATTAGTAAAG CACAATTGTC TAGTGACTTG GCTAAAGTAT CTGGCGGAGG AAACACAGGA	540
25	ACAGCGCCAG CTAAACCAAG CACACCAGCA CCTAAACCAA GCACACCATC TACTAACCTA	600
	GACAACTTG GCTTAGTAGA CTACATGAAC GCTAAGAAAA TGGACTCTAG CTACAGTAAC	660
	AGAGATAAGT TAGCTAAACA GTATGGTATT GCTAACTATT CAGGAACAGC TAGCCAGAAC	720
30	ACTACACTCC TTAGTAAAT TAAAGGAGGA GCACCTAAAC CAAGCACACC AGCACCTAAA	780
	CCTAGTACAT CTACAGCTAA GAAATTTAT TTCCACCAA ATAAAGGAAA CTGGTCTGTG	840
	TATCCAACAA ATAAAGCACC CGTTAAGGCT AATGCTATTG GTGCTATTAA CCCTACTAAA	900
35	TTCGGAGGAT TGACTTACAC TATCCAAAAA GATAGAGGAA ACGGTGTATA CGAAATCCAA	960
	ACAGACCAAT TCGGCAGAGT TCAAGTCTAT GGTGCACCTA GTACAGGAGC AGTTATCAAA	1020
	AAATAA	1026

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

[0031]

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 281 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

50 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

55 (B) STAMM: A118 Listeria - Phage

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Thr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Arg Ser Leu Ala Asn Val Asn Lys Leu
 1 5 10 15
 5 Ala Asp Asn Thr Lys Ala Ala Arg Arg Lys Leu Leu Asp Trp Ser Glu
 20 25 30
 Ser Asn Gly Ile Glu Val Leu Ile Tyr Glu Thr Ile Arg Thr Lys Glu
 35 40 45
 10 Gln Gln Ala Ala Asn Val Asn Ser Gly Ala Ser Gln Thr Met Arg Ser
 50 55 60
 Tyr His Leu Val Gly Gln Ala Leu Asp Phe Val Met Ala Lys Gly Lys
 65 70 75 80
 15 Thr Val Asp Trp Gly Ala Tyr Arg Ser Asp Lys Gly Lys Lys Phe Val
 85 90 95
 Ala Lys Ala Lys Ser Leu Gly Phe Glu Trp Gly Gly Asp Trp Ser Gly
 100 105 110
 20 Phe Val Asp Asn Pro His Leu Gln Phe Asn Tyr Lys Gly Tyr Gly Thr
 115 120 125
 Asp Thr Phe Gly Lys Gly Ala Ser Thr Ser Asn Ser Ser Lys Pro Ser
 130 135 140
 25 Ala Asp Thr Asn Thr Asn Ser Leu Gly Leu Val Asp Tyr Met Asn Leu
 145 150 155 160
 Asn Lys Leu Asp Ser Ser Phe Ala Asn Arg Lys Lys Leu Ala Thr Ser
 165 170 175
 30 Tyr Gly Ile Lys Asn Tyr Ser Gly Thr Ala Thr Gln Asn Thr Thr Leu
 180 185 190
 Leu Ala Lys Leu Lys Ala Gly Lys Pro His Thr Pro Ala Ser Lys Asn
 195 200 205
 35 Thr Tyr Tyr Thr Glu Asn Pro Arg Lys Val Lys Thr Leu Val Gln Cys
 210 215 220
 Asp Leu Tyr Lys Ser Val Asp Phe Thr Thr Lys Asn Gln Thr Gly Gly
 225 230 235 240
 40 Thr Phe Pro Pro Gly Thr Val Phe Thr Ile Ser Gly Met Gly Lys Thr
 245 250 255
 Lys Gly Gly Thr Pro Arg Leu Lys Thr Lys Ser Gly Tyr Tyr Leu Thr
 260 265 270
 45 Ala Asn Thr Lys Phe Val Lys Lys Ile
 275 280

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

50

[0032]

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

55

- (A) LÄNGE: 289 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

EP 0 781 349 B1

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

5 (B) STAMM: A 500 Listeria - Phage

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

10 Met Ala Leu Thr Glu Ala Trp Leu Ile Glu Lys Ala Asn Arg Lys Leu
1 5 10 15
Asn Ala Gly Gly Met Tyr Lys Ile Thr Ser Asp Lys Thr Arg Asn Val
20 25 30
15 Ile Lys Lys Met Ala Lys Glu Gly Ile Tyr Leu Cys Val Ala Gln Gly
35 40 45
Tyr Arg Ser Thr Ala Glu Gln Asn Ala Leu Tyr Ala Gln Gly Arg Thr
50 55 60
20 Lys Pro Gly Ala Ile Val Thr Asn Ala Lys Gly Gly Gln Ser Asn His
65 70 75 80
Asn Tyr Gly Val Ala Val Asp Leu Cys Leu Tyr Thr Asn Asp Gly Lys
85 90 95
25 Asp Val Ile Trp Glu Ser Thr Thr Ser Arg Trp Lys Lys Val Val Ala
100 105 110
Ala Met Lys Ala Glu Gly Phe Lys Trp Gly Gly Asp Trp Lys Ser Phe
115 120 125
30 Lys Asp Tyr Pro His Phe Glu Leu Cys Asp Ala Val Ser Gly Glu Lys
130 135 140
Ile Pro Ala Ala Thr Gln Asn Thr Asn Thr Asn Ser Asn Arg Tyr Glu
145 150 155 160
35 Gly Lys Val Ile Asp Ser Ala Pro Leu Leu Pro Lys Met Asp Phe Lys
165 170 175
Ser Ser Pro Phe Arg Met Tyr Lys Val Gly Thr Glu Phe Leu Val Tyr
180 185 190
40 Asp His Asn Gln Tyr Trp Tyr Lys Thr Tyr Ile Asp Asp Lys Leu Tyr
195 200 205
Tyr Met Tyr Lys Ser Phe Cys Asp Val Val Ala Lys Lys Asp Ala Lys
210 215 220
45 Gly Arg Ile Lys Val Arg Ile Lys Ser Ala Lys Asp Leu Arg Ile Pro
225 230 235 240
Val Trp Asn Asn Ile Lys Leu Asn Ser Gly Lys Ile Lys Trp Tyr Ala
245 250 255
50 Pro Asn Val Lys Leu Ala Trp Tyr Asn Tyr Arg Arg Gly Tyr Leu Glu
260 265 270

55

Leu Trp Tyr Pro Asn Asp Gly Trp Tyr Tyr Thr Ala Glu Tyr Phe Leu
275 280 285

5 Lys

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

10 [0033]

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15 (A) LÄNGE: 341 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(B) STAMM: A 511 Listeria - Phage

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

30

35

40

45

50

55

EP 0 781 349 B1

Met Val Lys Tyr Thr Val Glu Asn Lys Ile Ile Ala Gly Leu Pro Lys
1 5 10 15

5 Gly Lys Leu Lys Gly Ala Asn Phe Val Ile Ala His Glu Thr Ala Asn
20 25 30

Ser Lys Ser Thr Ile Asp Asn Glu Val Ser Tyr Met Thr Arg Asn Trp
35 40 45

10 Lys Asn Ala Phe Val Thr His Phe Val Gly Gly Gly Gly Arg Val Val
50 55 60

Gln Val Ala Asn Val Asn Tyr Val Ser Trp Gly Ala Gly Gln Tyr Ala
65 70 75 80

15 Asn Ser Tyr Ser Tyr Ala Gln Val Glu Leu Cys Arg Thr Ser Asn Ala
85 90 95

Thr Thr Phe Lys Lys Asp Tyr Glu Val Tyr Cys Gln Leu Leu Val Asp
100 105 110

20 Leu Ala Lys Lys Ala Gly Ile Pro Ile Thr Leu Asp Ser Gly Ser Lys
115 120 125

Thr Ser Asp Lys Gly Ile Lys Ser His Lys Trp Val Ala Asp Lys Leu
130 135 140

25 Gly Gly Thr Thr His Gln Asp Pro Tyr Ala Tyr Leu Ser Ser Trp Gly
145 150 155 160

Ile Ser Lys Ala Gln Phe Ala Ser Asp Leu Ala Lys Val Ser Gly Gly
165 170 175

30 Gly Asn Thr Gly Thr Ala Pro Ala Lys Pro Ser Thr Pro Ala Pro Lys
180 185 190

Pro Ser Thr Pro Ser Thr Asn Leu Asp Lys Leu Gly Leu Val Asp Tyr
195 200 205

35 Met Asn Ala Lys Lys Met Asp Ser Ser Tyr Ser Asn Arg Asp Lys Leu
210 215 220

Ala Lys Gln Tyr Gly Ile Ala Asn Tyr Ser Gly Thr Ala Ser Gln Asn

40

45

50

55

	225		230		235		240									
5	Thr	Thr	Leu	Leu	Ser	Lys	Ile	Lys	Gly	Gly	Ala	Pro	Lys	Pro	Ser	Thr
					245				250						255	
	Pro	Ala	Pro	Lys	Pro	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Lys	Lys	Ile	Tyr	Phe	Pro
				260					265					270		
10	Pro	Asn	Lys	Gly	Asn	Trp	Ser	Val	Tyr	Pro	Thr	Asn	Lys	Ala	Pro	Val
			275					280					285			
	Lys	Ala	Asn	Ala	Ile	Gly	Ala	Ile	Asn	Pro	Thr	Lys	Phe	Gly	Gly	Leu
		290					295					300				
15	Thr	Tyr	Thr	Ile	Gln	Lys	Asp	Arg	Gly	Asn	Gly	Val	Tyr	Glu	Ile	Gln
	305					310					315				320	
	Thr	Asp	Gln	Phe	Gly	Arg	Val	Gln	Val	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ser	Thr	Gly
					325					330					335	
20	Ala	Val	Ile	Lys	Lys											
				340												

25

Patentansprüche

1. Gereinigtes Listeriaphagenlysin aus den Phagen A188, A500 oder A511, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Listeriaphagenlysinen PLY188, PLY500 und PLY511.
2. Phagenlysin nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** eine Sequenz nach SEQ.ID.NO.:4.
3. Phagenlysin nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** eine Sequenz nach SEQ.ID.NO.:5.
4. Phagenlysin nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** eine Sequenz nach SEQ.ID.NO.:6.
5. Nukleinsäuresequenz, codierend ein Phagenlysin nach Anspruch 1.
6. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 5, **gekennzeichnet durch** eine Sequenz nach SEQ.ID.NO.:1.
7. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 5, **gekennzeichnet durch** eine Sequenz nach SEQ.ID.NO.:2.
8. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 5, **gekennzeichnet durch** eine Sequenz nach SEQ.ID.NO.:3.

45

Claims

1. Purified Listeria phage lysine from phages A188, A500 or A511 chosen from the group consisting of the Listeria phage lysines PLY188, PLY500 and PLY511.
2. Phage lysine according to claim 1, **characterized by** a sequence according to SEQ.ID.NO.:4.
3. Phage lysine according to claim 1, **characterized by** a sequence according to SEQ.ID.NO.:5.
4. Phage lysine according to claim 1, **characterized by** a sequence according to SEQ.ID.NO.:6.
5. Nucleic acid sequence coding a phage lysine according to claim 1.

55

EP 0 781 349 B1

6. Nucleic acid sequence according to claim 5, **characterized by** a sequence according to SEQ.ID.NO.:1.
7. Nucleic acid sequence according to claim 5, **characterized by** a sequence according to SEQ.ID.NO.:2.
- 5 8. Nucleic acid sequence according to claim 5, **characterized by** a sequence according to SEQ.ID.NO.:3.

Revendications

- 10 1. Lysine purifiée de phage de *Listeria*, provenant des phages A188, A500 ou A511, choisie dans le groupe constitué par les lysines de phage de *Listeria* PLY188, PLY500 et PLY511.
2. Lysine de phage selon la revendication 1, **caractérisée par** une séquence selon SEQ ID n° 4.
- 15 3. Lysine de phage selon la revendication 1, **caractérisée par** une séquence selon SEQ ID n° 5.
4. Lysine de phage selon la revendication 1, **caractérisée par** une séquence selon SEQ ID n° 6.
5. Séquence d'acide nucléique codant pour une lysine de phage selon la revendication 1.
- 20 6. Séquence d'acide nucléique selon la revendication 5, **caractérisée par** une séquence selon SEQ ID n° 1.
7. Séquence d'acide nucléique selon la revendication 5, **caractérisée par** une séquence selon SEQ ID n° 2.
- 25 8. Séquence d'acide nucléique selon la revendication 5, **caractérisée par** une séquence selon SEQ ID n° 3.

30

35

40

45

50

55